

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08308578 A**

(43) Date of publication of application: **26.11.96**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C12N 9/02
C12Q 1/26
/(C12N 9/02 , C12R 1:185)

(21) Application number: **07098857**

(22) Date of filing: **24.04.95**

(30) Priority: **27.07.94 JP 06193798**
14.03.95 JP 07 54625

(71) Applicant: **KIKKOMAN CORP**

(72) Inventor: **TATSUMI HIROKI**
FUKUDA MASARU
KIKUCHI MAMORU
KOYAMA TAIJI

(54) **BIOTIN FIRE FLY LUCIFERASE, BIOTIN FIRE FLY LUCIFERASE GENE, NEW RECOMBINANT DNA, PRODUCTION OF BIOTIN FIRE FLY LUCIFERASE AND BIOLUMINESCENCE ANALYSIS**

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Glu Lys Met Glu 15
Leu Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Asn Ile 30

Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys 55G
Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met 56B

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new enzyme by connecting a biotin peptide to a fire fly luciferase, capable of carrying out measurement in higher sensitivity by application to bioluminescence analysis, being utilized for enzyme immunoassaying measurement, DNA probe method, etc.

CONSTITUTION: This new biotin fire fly luciferase is obtained by connecting a biotin peptide to a fire fly luciferase or has an amino acid sequence of formula I or formula II or that deficient in or substituted with one or more amino acids in the amino acid sequence of formula I or II and has biotin fire fly luciferase activity. The luciferase enables measurement in higher sensitivity by application to bioluminescence analysis and is useful for a detection system utilizing biotin/avidin such as enzyme immunoassaying measurement method, immunological staining method, DNA probe method, receptor measurement method, in situ hybridization method, etc.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

Met Glu Asn Met Glu Asp Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu 15
Pro Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Glu Asn Arg 30

Lys Ala Ile Leu Val Glu Ser Gly Glu Pro Val Glu Phe Asp Glu 53D
Pro Leu Val Val Ile Glu 63B

II

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-308578

(43) 公開日 平成8年(1996)11月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09 9/02	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00 9/02	Z N A A
C 1 2 Q 1/26		6807-4B	C 1 2 Q 1/26	
// (C 1 2 N 9/02 C 1 2 R 1:185)				

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平7-98857	(71) 出願人	000004477 キッコーマン株式会社 千葉県野田市野田339番地
(22) 出願日	平成7年(1995)4月24日	(72) 発明者	辰巳 宏樹 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平6-193798	(72) 発明者	福田 賢 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
(32) 優先日	平6(1994)7月27日	(72) 発明者	菊地 護 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(31) 優先権主張番号	特願平7-54625		
(32) 優先日	平7(1995)3月14日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビオチン化ホタルルシフェラーゼ、ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子、新規な組み換え体 DNA、ビオチン化ホタルルシフェラーゼの製造法及び生物発光分析法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 ビオチン化ホタルルシフェラーゼ、(以下ルシフェラーゼと略す) ルシフェラーゼ遺伝子、新規な組み換え体 DNA、ルシフェラーゼの製造法及びルシフェラーゼを用いた生物発光分析法に関する。

【構成】 ビオチン化ペプチド及びホタルルシフェラーゼを連結してなることを特徴とするルシフェラーゼ、特定のアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ、ビオチン化ペプチドをコードする遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結してなることを特徴とするルシフェラーゼ遺伝子、特定のアミノ酸配列をコードするビオチン化ペプチド遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結してなるルシフェラーゼ遺伝子、前記ルシフェラーゼ遺伝子をベクター DNA に挿入した新規な組み換え体 DNA、エッシャーリシア属に属し、前記 DNA を含有する微生物を培地に培養し、培養物よりルシフェラーゼを採取するルシフェラーゼの製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビオチン化ペプチド及びホタルルシフェラーゼを連結してなることを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼ。

【請求項2】 配列番号6又は9で表されるアミノ酸配列を有する、或いは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており且つビオチン化ホタルルシフェラーゼ活性を有するビオチン化ホタルルシフェラーゼ。

【請求項3】 ビオチン化ペプチドをコードする遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結してなることを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項4】 配列番号1又は7で表されるアミノ酸配列或いは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており且つビオチン化ペプチド活性をもたらしアミノ酸配列をコードするビオチン化ペプチド遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結してなることを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項5】 請求項3又は4記載のビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入してなることを特徴とする新規な組み換え体DNA。

【請求項6】 エッシェリシア属に属し、請求項5記載の組み換え体DNAを含有する微生物を培地に培養し、培養物よりビオチン化ホタルルシフェラーゼを採取することを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼの製造法。

【請求項7】 請求項1又は2記載のビオチン化ホタルルシフェラーゼを用いることを特徴とする生物発光分析法。

【請求項8】 請求項1又は2記載のビオチン化ホタルルシフェラーゼを使用し、ビオチン化受容体を測定することにより、リガンドを定量することを特徴とする生物発光分析法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ビオチン化ホタルルシフェラーゼ、ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA、ビオチン化ホタルルシフェラーゼの製造法及びビオチン化ホタルルシフェラーゼを用いた生物発光分析法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、50%以上の活性を保持した化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼを用いる免疫測定法は知られている。(特開昭60-138463号公報参照) しながら、化学修飾ではビオチンの結合するルシフェラーゼ内の残基が特定できず、また、ルシフェラーゼ1分子に結合するビオチンの数も一定でなく、均一な性質を有するビオチン化ホタルルシフェラーゼを得ることはできない。

【0003】 従って、化学修飾で得られたビオチン化ホタルルシフェラーゼを、生物発光分析に用いた場合、検出感度は満足のできるものではなく、化学修飾で得られたビオチン化ホタルルシフェラーゼを、高感度を必要とする生物発光分析法に用いることは不適當であった。一方、ビオチン酵素の活性中心の1つと考えられる保存されたLys残基には、細胞内において、ビオチンホロエンザイムシンセターゼの作用によりビオチンが結合していることが知られている[D. Samols et al., The Journal of Biological Chemistry, 263, 6461 (1988)]。

【0004】 最近、ビオチン酵素のビオチン化Lys残基を含む領域と目的の蛋白質との融合蛋白質を遺伝子操作的手法により生産したところ、ビオチン化された該融合タンパク質が確認された[J. E. Cronal, Jr., The Biological Chemistry, 265, 10327(1990)]。Promega社では、上記の方法によりビオチン化ホタルルシフェラーゼの製造を行なった。すなわち、遺伝子操作的手法により、北米ホタル(Photinus pyralis)由来のルシフェラーゼと、ビオチン酵素の1つであるプロピオンバクテリウム・シェルマニイ(Propionibacterium shermanii)のトランスカルボキシラーゼコンプレックスの12.5 kDaサブユニットとの融合蛋白質の生産を試みた。しかしながら、得られた融合蛋白質は不溶性であり、活性のあるビオチン化ホタルルシフェラーゼはほとんど得られなかった[Promega社、ピンポイント テンエープロテイン ピュリフィケーション システム(PinPoint Xa Protein Purification System)パンフレット]。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、本発明は、上記欠点のないビオチン化ホタルルシフェラーゼ、ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子、ビオチン化ホタルルシフェラーゼの製造法及びこのルシフェラーゼを用いた生物発光分析法を提供することを目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行なった結果、エッシェリシア属に属し、配列番号1又は7で表されるアミノ酸配列をコードするビオチン化ペプチド遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結してなるビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入してなる組み換え体DNAを含有する微生物を培地に培養すれば、培養物より可溶性で活性のあるビオチン化ホタルルシフェラーゼが効率よく得られること、更にこのようにして得られたビオチン化ホタルルシフェラーゼを、生物発光分析に用いれば、化学修飾により得られたビオチン化ホタルルシフェラーゼを用いる生物発光分析法に比し高感度に分析することができること等の知見を得、本発明を完成した。

【0007】 すなわち本発明は、ビオチン化ペプチド及

びホタルルシフェラーゼを連結してなることを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼである。ここで、ビオチン化ペプチドとはビオチンホロエンザイムシンセターゼの作用によりビオチンを結合しうるペプチドをいう。更に本発明は、配列番号6又は9で表されるアミノ酸配列、或いは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており且つビオチン化ホタルルシフェラーゼ活性を有するビオチン化ホタルルシフェラーゼである。

【0008】更に本発明は、ビオチン化ペプチドをコードする遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結してなることを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子である。更に本発明は、配列番号1又は7で表されるアミノ酸配列或いは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されており且つビオチン化ペプチド活性をもたらしアミノ酸配列をコードするビオチン化ペプチド遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結してなることを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子である。

【0009】更に本発明は、上記ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入してなることを特徴とする新規な組み換え体DNAである。更に本発明は、エッシェリシア属に属し、上記組み換え体DNAを含有する微生物を培地に培養し、培養物よりビオチン化ホタルルシフェラーゼを採取することを特徴とするビオチン化ホタルルシフェラーゼの製造法である。

【0010】更に本発明は、上記ビオチン化ホタルルシフェラーゼを用いることを特徴とする生物発光分析法である。更に本発明は、上記ビオチン化ホタルルシフェラーゼを使用し、ビオチン化受容体を測定することにより、リガンドを定量することを特徴とする生物発光分析法である。

【0011】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、細胞内においてビオチンホロエンザイムシンセターゼの作用によりビオチンが結合する10~120 残基程度のペプチド（ビオチン化ペプチド）をコードする遺伝子とホタルルシフェラーゼの遺伝子を連結し、該連結遺伝子を微生物に導入し、該微生物が保有するビオチンホロエンザイムシンセターゼの作用によりビオチン化ペプチドがビオチン化された融合蛋白質を微生物に於いて生産することを必須とする。

【0012】本発明において、細胞内においてビオチンホロエンザイムシンセターゼの作用によりビオチンが結合するペプチド、即ちビオチン化ペプチドとしては、例えば、天然のビオチン酵素〔例えばThe Journal of Biological Chemistry, 263, 6461 (1988)に記載のビオチン酵素〕のビオチン化されたリジン残基を含む10~120 残基のペプチド、または、これらの配列を基に人工的に作られたビオチン化ペプチド〔例えばBIO/TECHNOLOGY, 11, 1138 (1993)に記載のペプチド〕が含まれる。

【0013】このビオチン化ペプチドの具体例としては、配列番号1又は7のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。なお、該ペプチドにおいてアミノ酸配列内の小さな変更がその活性を失うことなく行われることが期待される。このような変更には、配列内の1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換が含まれ、そしてそれらのうち上記ビオチン化の活性が維持されるものは本発明のビオチン化ペプチドの範囲に含まれる。そして、これらのアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたものは、周知のペプチド合成法により適宜調製できる。

【0014】ホタルルシフェラーゼとしては、例えば、ルシオラ・クルシアタ (Luciola cruciata)、ルシオラ・ラテラリス (Luciola lateralis)〔何れもN. Kajiyama et al., Biochim. Biophys. Acta, 1120, 228 (1992)〕、ルシオラ・ミングレリカ (Luciola mingrelica)〔N. Yu. Philippova and N. N. Ugarova, Biokhimiya, 44, 1508 (1979)〕、フォティナス・ピラリス [M. Deluca and W.D. McElroy, Meth. Enzymol., 72, 3 (1978)] 等のホタル由来のルシフェラーゼが挙げられる。そのうちヘイケボタル (Luciola lateralis) 由来で、217番目のAlaがLeuに置換された耐熱性変異型ルシフェラーゼのアミノ酸配列は配列番号2に示す通りである。

【0015】ビオチン化ペプチドの遺伝子はDNA合成機により合成することができる。ホタルルシフェラーゼの遺伝子は通常の方法 [J. Sambrook et al. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] によりクローニングするか、または、配列が既知の場合はPCR法によりクローニングすることができる。

【0016】ビオチン化ペプチドとホタルルシフェラーゼの融合蛋白質（ビオチン化ホタルルシフェラーゼ）は、両者の機能を損なわない範囲で、一次配列上の配置にはこだわらない。すなわち、いずれをN末に配置してもよく、また、一方を他方の分子内に配置する場合もある。また、両者の間にリンカー配列、例えば(GlySer)〔J. S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988)〕やSer Ser Ala(Asp Asp Ala Lys Lys) Asp Gly [M. W. Pantoliano et al., Biochemistry, 30, 1017 (1991)]、を配置してもよい。

【0017】ビオチン化ペプチドの遺伝子とホタルルシフェラーゼの遺伝子とを通常の方法 [J. Sambrook et al. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] により結合し、このビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子を、通常の方法により、プロモーター配列、マーカー遺伝子、複製起点を有するベクターに連結し、微生物、例えば大腸菌 (Escherichia coli) や酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 等に形質転換し、組み換え体を取得することができる。

【0018】上記ベクターDNAとしては、例えば、pUC119 (宝酒造社・製)、pMA56 [G. Ammerer, Meth. Enzymol., 101, 192 (1983)] 等が挙げられる。ビオチン化ホタルルシフェラーゼを生産するには、上記組み換え体DNAを有する微生物を培地中で培養することにより、該微生物の保有するビオチンホロエンザイムシンセンタラーゼの作用によりビオチン化ペプチド内の保存されたLys残基がビオチン化された融合蛋白質が得られる。この微生物の培養は固体培養法で培養してもよいが、液体培養法により培養するのが好ましい。

【0019】また、培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーあるいは大豆もしくは小麦ふすま浸出液等の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸1カリウム、リン酸2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄、あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

【0020】なお、培地の初発pHは、pH7~9に調製するのが適当である。また培養は30~42℃、好ましくは37℃前後で3~24時間、好ましくは5~8時間、通気攪はん深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりビオチン化ホタルルシフェラーゼの採取は、例えば、該培養物を遠心分離にかけ培養上清と菌体を得、菌体は超音波処理や溶菌酵素処理により破碎する。次いで、これら培養上清または菌体破碎液からビオチン化ホタルルシフェラーゼの精製は、常法の精製手段、例えば硫酸沈澱、ゲル濾過、イオン交換クロマト、疎水クロマト等を組み合わせることにより行うことができる。菌体上清または菌体破碎液中のビオチン化ホタルルシフェラーゼ融合蛋白の活性は、E. A. Bayerら記載の方法 [Anal. Biochem., 154, 367 (1986)] とJ. R. De Wet等の方法 [Meth. Enzymol., 133, 3 (1986)] により測定することができる。

【0021】このようにして得られたビオチン化ホタルルシフェラーゼは、種々の生物発光分析法に利用できる。ビオチン化ホタルルシフェラーゼは、そのビオチンを介してルシフェラーゼとアビジンまたはストレプトアビジンとの複合体を作成することにより、例えば、現在多用されている酵素免疫測定法、DNAプローブ法、免疫染色法、レセプター測定法、in situハイブリダイゼーション法等のビオチン・アビジンを利用した検出系にホタルルシフェラーゼを用いた発光分析法を適用することができる [北川常廣等編, 酵素免疫測定法 (蛋白質核酸酵素別冊No. 31) (1987), 共立出版, P. Tijssen著, 石川栄治監訳, エンザイムイムノアッセイ (1989), 東京化学同人, 高橋豊三著, DNAプローブ (1988), シーエムシー]。

【0022】

【実施例】以下、本発明を実施例を挙げて更に具体的に

説明する。

実施例

1. ビオチン化ホタルルシフェラーゼ bL203を発現するプラスミドの作製

ビオチン化ペプチド #84 (Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Leu Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser) [P. J. Shatz, BIO/TECHNOLOGY, 11, 1138 (1993), ビオチンホロエンザイムシンセンタラーゼの作用により13番目のLys残基がビオチン化されると考えられる。] をコードし、下流に制限酵素XhoI部位と制限酵素MunI部位を持つオリゴヌクレオチド [順鎖のSLF69 (配列番号3) と逆鎖のSLF70 (配列番号4) の合計2本] をDNA Model 392 シンセサイザー (Applied Biosystems社・製) を用いて合成した。

【0023】オリゴヌクレオチドSLF69及びSLF70各々1 pmolをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社・製) を用いてリン酸化した後、両者を混合し、90℃にて10分間保温後、更に37℃にて10分間保温し、2種のオリゴヌクレオチドのアニーリングを行なった。次いで、プラスミドpUTE100DNA (特開平5-317055号公報記載) を制限酵素HpaIで切断した後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造社・製) にて脱リン酸化を行ない、これに上記のアニーリングしたオリゴヌクレオチドを加え、T4DNAリガーゼ (宝酒造社・製) を用いて連結し、プラスミドpUTE100DNAのHpaI部位にビオチン化ペプチド#84をコードするオリゴヌクレオチドがβ-ガラクトシダーゼプロモーターより順方向に転写される方向に挿入された組み換え体プラスミドpHLf200DNAを取得した (図1参照)。

30 【0024】一方、組み換え体プラスミドpHLf7-217Leu [プラスミドpUC119に217番目のAlaがLeuに置換された耐熱変異型ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子 (特開平5-244942号公報記載) が挿入されたものであり、この耐熱性変異型ヘイケボタルルシフェラーゼのアミノ酸配列を配列番号2に示す。] の1本鎖DNAをヘルパーファージM13 K07 (宝酒造社・製) を用いて調製し、オリゴヌクレオチドSLF15 (AGGAATAAAGAAGCTCTTCACAGTT) とオリゴヌクレオチド-ダイレクティッド インビトロ ミュータジェネシス システム バージョン2 (Amersham社・製) を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子がコードするアミノ酸配列は変えずにルシフェラーゼ遺伝子の内部に存在するEcoRI部位を除去したプラスミドpHLf107DNAを得た (図1参照)。次いで、同様の方法により、組み換え体pHLf107DNAのルシフェラーゼ遺伝子の5'端付近に、オリゴヌクレオチドSLF43 (TTCATCGTTCTCGAGGTTTCCATAGA) (下線部は制限酵素XhoI部位) を用いてXhoI部位を導入したプラスミドpHLf108を取得した (図1参照)。

40 【0025】pHLf108を制限酵素XhoI (宝酒造社・製) 及びEcoRI (同社・製) で切断した後、アガロースゲル

電気泳動とgene clean II kit (BIO101社・製)によりルシフェラーゼ遺伝子断片を調製した。この断片を、予めXhoIとMunI(何れも宝酒造社・製)で切断したpHLf200と連結し、ビオチン化ホタルルシフェラーゼ bL203を β -ガラクトシダーゼプロモーターにより発現させることのできる組み換え体プラスミドpHLf203DNAを構築した(図1参照)。組み換え体プラスミドpHLf203DNAの有するビオチン化ホタルルシフェラーゼ bL203遺伝子の塩基配列及び該遺伝子から発現されるアミノ酸配列を夫々配列番号5及び配列番号6に示した。

【0026】2. ビオチン化ホタルルシフェラーゼ bL203の大腸菌による生産の確認

組み換え体プラスミドpHLf203DNAを含有する大腸菌JM101[pHLf203]〔宿主菌としては大腸菌JM101(ATCC33876)を使用〕(尚、大腸菌JM101[pHLf203]は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM B P-5052として寄託されている。)を0.2 mMのイソプロピル- β -チオガラクトサイド(IPTG)と50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地(1% バクトトリプトン, 0.5%酵母エキス, 0.5%塩化ナトリウム) 2 mlにて、30℃、120 rpmで5時間振とう培養した。5,000 r.p.m.で5分間遠心分離により得られた菌体を超音波処理により破碎し、12,000 r.p.m.で5分間遠心分離により菌体破碎液上清を得た。

【0027】菌体破碎液上清のビオチン化ホタルルシフェラーゼ bL203の活性は以下の方法にて測定した。マイクロタイターイムノアッセイプレートFluoroNunc Plates C96 White Maxisorp (Nunc社・製)のウェルに100 μ lのビオチン化牛血清アルブミン(BSA)溶液〔10 μ g/ml ALBUMIN BOVINE-BIOTIN Labeled (SIGMA), 15 mM炭酸ナトリウム (pH 9.6)〕を加え、4℃にて16時間放置し、ビオチン化BSAの固定を行なった。ウェルよりビオチン化BSA溶液を廃棄し、各ウェルを300 μ lのTPBS〔0.05% トウイーン (tween) 20, 65 mM 塩化ナトリウム, 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2)〕にて洗浄したのち、300 μ lのブロッキング溶液〔1% BSA, 65 mM塩化ナトリウム, 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2)〕を加え、37℃にて2時間放置し、ウェルのブロッキングを行なった。ブロッキング溶液を廃棄後、300 μ lのTPBSで各ウェルを洗浄し、100 μ lのアビジン溶液〔PBSにアビジン(和光純薬社・製)を10 μ g/mlとなるように溶解したもの〕または対照として同量のPBSを加え、室温で1時間放置した。TPBSで各ウェルを洗浄後、上述の大腸菌JM101[pHLf203]の菌体破碎液上清をTBSで10倍に希釈した溶液100 μ lを加え、室温にて1時間放置した。菌体破碎液上清希釈液を廃棄し、各ウェルを300 μ lのTPBSにて4回洗浄した。

【0028】各ウェルのルシフェラーゼ活性を以下の方法で測定した。マイクロタイターイムノアッセイプレートをマイクロプレートリーダーML3000 (DYNATECH社・製)に装着し、100 μ lの基質溶液〔0.069 mMルシ

フェリン (SIGMA社・製), 4mM ATP, 4.3 mM塩化マグネシウム, 25 mM グリシルグリシン (pH 7.8)〕を加え、20秒間に発生するフォトン数を測定した。その結果、アビジン無添加の対照のウェルでの発光が96カウントであったのに対し、アビジンを添加したウェルでは27,000カウントの発光が観察され、顕著なルシフェラーゼ活性の増加が認められた。従って、大腸菌JM101[pHLf203]の菌体破碎液上清には、アビジンに対し結合能を有するホタルルシフェラーゼ、すなわち活性のあるビオチン化ホタルルシフェラーゼ bL203の生産が確認された。

【0029】3. ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203の精製

大腸菌JM101[pHLf203]を0.2 mMのイソプロピル- β -チオガラクトサイド(IPTG)と50 μ g/mlのアンピシリン及び10 μ g/mlのD-biotinを含むLB培地(1% バクトトリプトン, 0.5%酵母エキス, 0.5%塩化ナトリウム) 1リッターにて、30℃、120rpmで5時間振とう培養した。5,000 r.p.m.で5分間遠心分離により得られた菌体を100 mlの緩衝液〔25 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10%飽和硫酸アンモニウム, 1mg/mlリゾチーム, pH7.8〕に懸濁した。凍結融解を3回繰り返して菌体の溶菌を行ない、12,000 r.p.m.で5分間遠心により菌体破碎液上清を得た。菌体破碎液上清よりbL203の精製は梶山等の方法〔N. Kajiyama et al., Biochim. Biophys. Acta, 1120, 228 (1992)〕に従った。精製したbL203の濃度は紫外吸光法に従い測定した。精製したbL203の比活性は、217番目のAlaがLeuに置換され、精製された耐熱性ヘイクボタルルシフェラーゼの比活性の98%であった。また、精製したbL203は4℃で60日以上保存しても活性の減少は認められなかった。

【0030】4. 化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼの作成

本発明のビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203と比較実験を行なうために、特開昭60-138463号公報記載の方法に従い化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼの作成を行なった。ホタルルシフェラーゼとしては公報に従いシグマケミカル社より入手したフォティナス・ピラリス由来のホタルルシフェラーゼを使用した。反応用緩衝液〔0.1 M 塩化ナトリウム, 0.1 M リン酸カリウム(pH 7.6)〕中2.6 mg/mlのホタルルシフェラーゼ400 μ lに、592 μ lの同じ緩衝液に溶解した5.5 μ モル ATP、及び8 μ lのジメチルスルホキシド中60 nモルのN-ヒドロキシスクシニミドビオチン(ピアス社・製)を加えた。4℃にて一夜インキュベーションした後、緩衝液〔10% グリセロール, 1 mM EDTA, 2 mM β -メルカプトエタノール, 0.1 M リン酸カリウム(pH 7.5)〕に透析した。この標識反応後未修飾のホタルルシフェラーゼの活性と比較して62%の活性が残存しており、前記公報に記載の少なくとも50%以上の活性が残留する化学修飾ビオチン化ホタル

ルシフェラーゼが得られたが、本発明の方法により得られたビオチン化ホタルルシフェラーゼの活性98%には遠く及ばなかった。

【0031】5. ストレプトアビジン結合による活性の変化

ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203及び化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼのストレプトアビジンと結合した際の活性変化を測定した。各ビオチン化ホタルルシフェラーゼをルシフェラーゼ希釈液〔1% BSA, 1 mM EDTA, 1 mM β -メルカプトエタノール, 50 mM HEPES (pH 7.5)〕で0.1 ng/mlに希釈した液と、ストレプトアビジン（ベーリンガー・マンハイム社・製）をルシフェラーゼ希釈液で1 μ g/mlに希釈した液または対照としてルシフェラーゼ希釈液を等量混合し、室温で30分間放置した。これらの液を各50 μ lずつマイクロタイタープレート Microlite 2（ダイナテックラボラトリーズ社・製）のウエルに移し、生物発光・化学発光測定用マイクロプレートリーダー LUMINOUS CT-9000D（ダイアヤトロン社・製）に装着し、基質溶液〔40 mM ATP, 1.4 mMルシフェリン, 300 mM硫酸マグネシウム, 50 mM HEPES (pH 7.5)〕を50 μ lずつ分注しつづつ10秒間に発生するフォトン数を測定した。その結果、ストレプトアビジンと混合後の残存活性はビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203で93%、化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼで62%であり、本発明のビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203ではほとんど活性変化がないのに対し、化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼにおいては40%近く活性が低下することが明らかになった。

【0032】6. ビオチン化ホタルルシフェラーゼ bL203を用いたサンドイッチELISA

マイクロタイタープレート Microlite 2にヤギ抗マウスIgG Fcフラグメント特異的ポリクローナル抗体（ジャク

- * ソンイムノリサーチ社・製）を50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で5 μ g/mlに希釈し、各ウエルに100 μ lずつ分注し4℃で一夜固相化した。各ウエルを300 μ lのT-TBS〔0.05% トウイーン20, 0.15M NaCl, 50 mM Tris (pH 7.6)〕で4回ずつ洗浄し、各ウエルに200 μ lの4倍希釈したブロックエース（大日本製薬株式会社）を加え、4℃で一夜ブロッキングした。同様に洗浄を行なった後、4倍希釈したブロックエースで1 pg/ml~1000 pg/mlまでの各濃度に調製したマウスIgG₁（ケミコン社・製）及び陰性対照として4倍希釈ブロックエースを100 μ lずつ添加し37℃で2時間放置した。洗浄後、ビオチン化ヤギ抗マウスIgG F(ab')₂フラグメント特異的ポリクローナル抗体F(ab')₂フラグメント（ジャクソンイムノリサーチ社・製）を4倍希釈ブロックエースで0.1 μ g/mlに希釈したものを100 μ lずつ加え、37℃で1時間放置した。洗浄後、ストレプトアビジン（ベーリンガー・マンハイム社・製）を4倍希釈ブロックエースで2 μ g/mlに希釈して100 μ lずつ加え、室温で30分間放置した。それを洗浄後、ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203及び化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼをルシフェラーゼ希釈液で5 \times 10⁻¹³ mol/mlに希釈し、100 μ lずつ添加し室温で30分間放置した。洗浄後、ルシフェラーゼ希釈液〔1% BSA, 1 mM EDTA, 1 mM β -メルカプトエタノール, 50 mM HEPES (pH 7.5)〕を各ウエルに50 μ lずつ分注し、生物発光・化学発光測定用マイクロプレートリーダー LUMINOUS CT-9000D（ダイアヤトロン社・製）に装着し、基質溶液〔40 mM ATP, 1.4 mMルシフェリン, 300 mM硫酸マグネシウム, 50 mM HEPES (pH 7.5)〕を50 μ lずつ分注しつづつ10秒間に発生するフォトン数を測定した結果を表1に示した。

【0033】

【表1】

マウスIgG ₁ 濃度 (pg/ml)	ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203を使用した場合の発光量 (count)注1	化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼを使用した場合の発光量 (count)注1
0	5633	131
1	5773	156
5	6906	151
10	7781	158
50	16319	196
100	24950	241
1000	162429	1117

注1：4エルの測定の平均値

【0034】表1から明らかなように、ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203はスチューデントのt検定 (R. C. キャンベル著, 石居進訳, 生物学者のための統計学

※入門(第2版)(1976), 培風館)によりP<0.05で5 pg/mlより測定が可能であり、それに対し化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼは同様に95%以上の有意差で50p

g/mlより測定が可能であった。以上より本発明によるビオチン化ホタルルシフェラーゼは、従来の化学修飾法によるビオチン化ホタルルシフェラーゼに比べ、それを用いた実際の測定においても10倍高い感度が得られることが明らかになった。

【0035】7. ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248を発現させるプラスミドの作製

大腸菌のアセチルCoAカルボキシラーゼのサブユニットであるビオチンカルボキシルキャリアープロテイン（以下、BCCPという）は大腸菌内でビオチンホロエンザイムシンセターゼの作用により122番目のLys残基がビオチン化されていることが知られている〔The Journal of Biological Chemistry, 263, 6461 (1988)〕。BCCPのbiotin化Lys残基を含むC末端側の87残基よりなるポリペプチド（以下、BCCP-87という、配列番号7）をコードする遺伝子を以下の方法によりクローニングした。特開平6-292584号公報記載の方法により大腸菌1100 (Max-Plank-Institute、ドイツ、ハイデルベルグより入手)から染色体DNAを取得し変性させた。S. Muramatsuらの報告〔Nucleic Acids Research, 17, 3982 (1989)〕のBCCP遺伝子の塩基配列を参考に、5'側のプライマーとしてオリゴヌクレオチドSLF116 (CCGGCGACCGTTGGATCCATGGAAGC G) 及び3'側のプライマーとしてオリゴヌクレオチドSLF117 (TTATCCAGCGGATCCACTAGTTTACTCGATGACGACGACGG) をDNA Model 392 シンセサイザー (Applied Biosystems 社・製) を用いて合成した。なお、夫々のプライマーの内部に後のサブクローニングのため、制限酵素BamHIの認識部位（下線部）を導入した。プライマーSLF116とプライマーSLF117各1 pmolと上述の変性させた大腸菌の染色体DNA 0.1 µgを用いて、DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer社・製) 及びAmpli Taq DNAポリメラーゼを含むGeneAmp PCR試薬キット（宝酒造社・製）によるPCR増幅を行ない、BCCP-87をコードする遺伝子断片1 µgを得、更に、この断片をBamHIにより消化した。

【0036】一方、プラスミドpHLf107DNA（図1参照）のルシフェラーゼ遺伝子の3'端付近に、オリゴヌクレオチドSLF81 (TGATTGACATGGATCCCTTAGCAACT)（下線部は制限酵素BamHI部位）を用いて、項目1に記載の部位特異的変異法によりBamHI部位を導入したプラスミドpHLf142DNAを取得した（図2参照）。次いで、プラスミドpHLf142DNAを制限酵素BamHI（宝酒造社・製）及びEcoRI（同社・製）で完全に消化した後、アガロースゲル電気泳動とgene clean II kit (BI0101社・製)によりルシフェラーゼ遺伝子断片を調製した。この断片を、予めBamHIとEcoRIで切断したプラスミドpUC118 DNA（宝酒造社・製）と連結し、プラスミドpHLf230DNAを構築した（図2参照）。

【0037】プラスミドpHLf230DNAをBamHIで切断し、上述のBamHIで消化したBCCP-87遺伝子断片と常法に従い結合させ、耐熱性ヘイクバタルルシフェラーゼ（配

列番号2)のC末端にBCCP-87が融合したビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248をβ-ガラクトシダーゼプロモーターにより発現させることのできる組み換え体プラスミドpHLf248DNAを構築した（図2参照）。組み換え体プラスミドpHLf248の有するビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248遺伝子の塩基配列及び該遺伝子から発現されるアミノ酸配列を夫々配列番号8及び配列番号9に示した。

【0038】8. ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248の大腸菌による生産の確認

組み換え体プラスミドpHLf248DNAを含有する大腸菌JM101[pHLf248]〔宿主菌として大腸菌JM101 (ATCC33876)を使用〕（尚、大腸菌JM101[pHLf248]は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5081として寄託されている。）を、項目2記載の方法にて、培養及びビオチン化ルシフェラーゼの活性測定を行なった。その結果、アビジン無添加のウエルでの発光が75カウントであったのに対し、アビジンを添加したウエルでは1,000カウントの発光が観察された。すなわち、大腸菌JM101[pHLf248]は活性のあるビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248を生産することが確認された。

【0039】9. ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248の粗精製

項目3記載の方法により、大腸菌JM101[pHLf248]を培養し菌体破碎液上清を得た。梶山等の方法 (N. Kajiyama et al., Biochim. Biophys. Acta, 1120, 228(1992))に従い、菌体破碎液上清より30%-60%飽和硫酸で沈澱する画分を取得し、緩衝液（25mM Tris, 1 mM EDTA, 10% 飽和硫酸アンモニウム, pH7.8）に懸濁し、粗精製標品とした。なお、ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248がストレプトアビジンと結合した際の活性の変化を項目5記載の方法により測定した結果、残存活性は102%であり、ストレプトアビジンと結合しても活性の低下は認められなかった。

【0040】10. ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248を用いたサンドイッチELISA

項目6記載の方法により、ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248の粗酵素液を用いてマウスIgG_{1A}をサンドイッチELISAにより定量した（表2）。なお、用いたビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248の量は項目6で用いたビオチン化ホタルルシフェラーゼbL203と同量の活性量を用いた。表2から明らかのように、ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248はスチューデントのt検定によりP<0.05で10 pg/mlより測定が可能であり、従来の化学修飾ビオチン化ホタルルシフェラーゼの測定限界の50 pg/ml（表1）に比べ5倍高い感度が得られることが明らかになった。

【0041】

【表2】

マウスIgG _{1a} 濃度 (pg/ml)	ビオチン化ホタルルシフェラーゼbL248 を使用した場合の発光量 (count) 注 1
0	379
1	376
5	394
10	458
50	856
100	1393
1000	11219

注 1 : 4 ウェルの測定の前平均値

【0042】

【発明の効果】本発明により、ビオチン化ホタルルシフェラーゼ、ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA、ビオチン化ホタルルシフェラーゼの製造法及び生物発光分析法が提供された。そして、本発明によりホタルルシフェラーゼ中の特定の残基にビオチンが1個結合した均一な構造を持ち、ビオチン化により活性がほとんど損なわれることがなく、更にストレプトアビジンまたはアビジンに結合しても活性の低下が認められない均一な性質のビオチン化ホタルルシフェラーゼを効率よく生産することが可能となり、また本発明により得られた均一な性質のビオチン化ホタルルシフェラーゼは、従来の化学修飾により得られたビオチン化ホタルルシフェラーゼと比較して、生物発光分析に適用した場合、より高感度な測定が可能であるため、本発明は、産業上極めて有用である。

【0043】
【配列表】
20 配列番号：1
配列の長さ：23
配列の型：アミノ酸
トポロジー：不明
配列の種類：ペプチド
配列の特長：ビオチン化ペプチド#84、13番目のLys残基がビオチンホロエンザイムシンセターゼの作用によりビオチン化される

配列：

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu 15
Leu Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser 23

【0044】配列番号：2

配列の長さ：548

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

※起源：Luciola lateralis

配列の特長：ヘイケボタル (Luciola lateralis) 由来の、217番目のAlaがLeuに置換された耐熱性変異型ホタルルシフェラーゼ (特開平5-244942号公報記載) のアミノ酸配列

配列：

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu 15
Pro Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg 30
Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr 45
Asn Ala Leu Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu 60
Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val 75
Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe 90
Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala 105
Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu 120
Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu 135
Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr 150
Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly Tyr Gln Ser 165
Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly 180
Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu Gln Val Ala 195
Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr50 Gly Leu Pro Lys Gly Val 210

15

16

Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala Arg 225
 Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu 240
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu 255
 Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe 270
 Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser 285
 Ser Val Ile Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser 300
 Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala 315
 Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala 330
 Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr 345
 Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys 360
 Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val 375
 Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly 390
 Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asp 405
 Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu 420
 His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys His Phe Phe 435
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln 450
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro Asn 465
 Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly 480
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu Lys Gly Lys Ser Met 495
 Thr Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn 510
 Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro 525
 Lys Gly Leu Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile 540
 Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met 548

【0045】配列番号：3

配列の長さ：85

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特長：オリゴヌクレオチドSLF69

*

配列：

ATGGCATTTCATTACGTTCTATTCTTGAAGCTCAAAAAATGGAATTACGTAACACTCCA 60
 GGAGGTAGTCTCGAGGCTACAATTG 85

【0046】配列番号：4

配列の長さ：85

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特長：オリゴヌクレオチドSLF70

※

配列：

CAATTGTAGCCTCGAGACTACCTCCTGGAGTGTTACGTAATCCATTTTGGAGCTTCAA 60
 GAATAGAACGTAATGAAAATGCCAT 85

【0047】配列番号：5

配列の長さ：1704

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

★ トポロジー：不明

配列の種類：DNA

40 配列の特長：組み換え体プラスミドpHLf203 DNAの持つ

★ ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列

配列：

ATGGCATTTCATTACGTTCTATTCTTGAAGCTCAAAAAATGGAATTACGTAACACTCCA 60
 GGAGGTAGTCTCGAGAACGATGAAAATATTGTGTATGGTCTGAACCATTTTACCCTATT 120
 GAAGAGGGATCTGCTGGAGCACAAATGCGCAAGTATATGGATCGATATGCAAACTTGGA 180
 GCAATTGCTTTTACTAACGCACCTTACCGGTGTCGATTATACGTACGCCGAATACTTAGAA 240
 AAATCATGCTGTCTAGGAGAGGCTTTAAAGAATTATGGTTTGGTTGTTGATGGAAGAATT 300
 GCGTTATGCAGTGAAAACGTGAAGAGTTCTTTATTCCTGTATTAGCCGGTTTATTATATA 360
 GGTGTCGGTGTGGCTCCAATAAGAGATTACACTCTACGTGAATTGGTTCACAGTTTA 420
 GGCATCTCTAAGCCAACAATTGTATTTAGTTCTAAATAAGGATTAGATAAAGTTATAACT 480

17

18

GTACAAAAACGGTAACCTGCTATTAAAAACCATTTGTTATATTGGACAGCAAAGTGGATTAT 540
 AGAGGTTATCAATCCATGGACAACCTTTATAAAAAAACACTCCACAAGGTTTCAAAGGA 600
 TCAAGTTTTAAACTGTAGAAGTTAACCGCAAAGAACAAGTTGCTCTTATAATGAACCTCT 660
 TCGGGTTCAACCGGTTTGCCAAAAGGTGTCAACTTACTCATGAAAATTTGGTCACGCGT 720
 TTTTCTCAGCTAGAGATCCAATTTATGGAAACCAAGTTTCACCAGGCACGGCTATTTTA 780
 ACTGTAGTACCATTCCATCATGGTTTTGGTATGTTTACTACTTTAGGCTATCTAACTTGT 840
 GGTTTTCGTATTGTTCATGTTAACGAAATTTGACGAAGAGACTTTTTTAAAAACACTGCAA 900
 GATTACAAATGTTCAAGCGTTATTCTTGTACCGACTTTGTTTGCATTTCTTAATAGAAGT 960
 GAATTACTCGATAAATATGATTTATCAAATTTAGTTGAAATTCATCTGGCGGAGCACCT 1020
 TTATCTAAAGAAATGGTGAAGCTGTGCTAGACGTTTAAATTTACCGGGTGTTCGTCAA 1080
 GGCTATGGTTTAAACAGAAACAACCTCTGCAATTATTATCACACCGGAAGGCGATGATAAA 1140
 CCAGGTGCTTCTGGCAAAGTTGTGCCATTATTTAAAGCAAAGTTATCGATCTTGATACT 1200
 AAAAAAATTTGGGCCCGAACAGACGTGGAGAAGTTTGTGTAAGGGTCTATGCTTATG 1260
 AAAGGTTATGTAGATAATCCAGAAGCAACAAGAGAAATCATAGATGAAGAAGGTTGGTTG 1320
 CACACAGGAGATATTGGGTATTACGATGAAGAAAAACATTTCTTTATCGTGGATCGTTTG 1380
 AAGTCTTTAATCAAATACAAAGGATATCAAGTACCACCTGCTGAATTAGAATCTGTTCTT 1440
 TTGCAACATCCAAATATTTTTGATGCCGCGTTGCTGGCGTTCCAGATCCTATAGCTGGT 1500
 GAGCTTCCGGGAGCTGTGTTGTAAGTAAAGGAAATCTATGACTGAAAAAGAAAGTA 1560
 ATGGATTACGTTGCTAGTCAAGTTTCAAATGCAAAACGTTTGGTGGTGGTGTCCGTTTT 1620
 GTGGACGAAGTACCTAAAGGTCTCACTGGTAAATGACGGTAAAGCAATTAGAGAAATA 1680
 CTGAAGAAACAGTTGCTAAGATG 1704

【0048】配列番号：6

配列の長さ：568

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

起源：Luciola lateralis

* 配列の特長：組み換え体プラスミドpHLf203 DNAの持つ
 ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列より
 演繹されるアミノ酸配列、13番目のLys残基がビオ
 チンホロエンザイムシンセターゼの作用によりビオチン
 化される

*

配列：

Met Ala Phe Ser Leu Arg Ser Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu 15
 Leu Arg Asn Thr Pro Gly Gly Ser Leu Glu Asn Asp Glu Asn Ile 30
 Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala 45
 Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly 60
 Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr 75
 Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys 90
 Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu 105
 Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile 120
 Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu 135
 Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser 150
 Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val 165
 Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr 180
 Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro 195
 Gln Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg 210
 Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly 225
 Leu Pro Lys Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg 240
 Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro 255
 Gly Thr Ala Ile Leu Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly 270
 Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val 285
 Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln 300
 Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala 315
 Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn 330

19

20

Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Ile 345
 Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln 360
 Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro 375
 Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu 390
 Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly 405
 Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met 420
 Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp 435
 Glu Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu 450
 Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys 465
 Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu 480
 Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro 495
 Asp Pro Ile Ala Gly Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu 510
 Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala 525
 Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe 540
 Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys 555
 Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met 568

【0049】配列番号：7

配列の長さ：87

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

起源：大腸菌

* 配列の特長：大腸菌由来のアセチルCoAカルボキシラー

ゼのサブユニットであるビオチンカルボキシルキャリア

ープロテインのC末端側の87残基よりなるポリペプチ

ド (BCCP-87)、53番目のLys残基がビオチンホロエン

ザイムシンセターゼの作用によりビオチン化される

*

配列：

Met Glu Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ile Ser Gly His Ile Val Arg 15
 Ser Pro Met Val Gly Thr Phe Tyr Arg Thr Pro Ser Pro Asp Ala 30
 Lys Ala Phe Ile Glu Val Gly Gln Lys Val Asn Val Gly Asp Thr 45
 Leu Cys Ile Val Glu Ala Met Lys Met Met Asn Gln Ile Glu Ala 60
 Asp Lys Ser Gly Thr Val Lys Ala Ile Leu Val Glu Ser Gly Gln 75
 Pro Val Glu Phe Asp Glu Pro Leu Val Val Ile Glu 87

【0050】配列番号：8

配列の長さ：1908

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

※ トポロジー：不明

配列の種類：DNA

配列の特長：組み換え体プラスミドpHLf248 DNAの持つ

※ ビオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列

配列：

ATGGAACACATGGAGAACGATGAAATATTGTGTATGGTCCTGAACCATTTTACCCTATT 60
 GAAGAGGGATCTGCTGGAGCACAATTGCGCAAGTATATGGATCGATATGCAAACTTGA 120
 GCAATTGCTTTTACTAACGCACCTTACCGGTGTCGATTATACGTACGCCGAATACTTAGAA 180
 AAATCATGCTGTCTAGGAGAGGCTTTAAAGAATTATGGTTTGGTTGTTGATGGAAGAATT 240
 GCGTTATGCAGTGAACCTGTGAAGAGTTCTTTATTCCTGTATTAGCCGGTTTATTATA 300
 GGTGTGCGGTGTGGCTCCAATAATGAGATTTACACTCTACGTGAATTGGTTCACAGTTTA 360
 GGCATCTCTAAGCCAACAATTGTATTTAGTTCTAAAAAAGGATTAGATAAAGTTATAACT 420
 GTACAAAAACGGTAACTGCTATTAACCAATTGTTATATTGGACAGCAAAAGTGGATTAT 480
 AGAGGTTATCAATCCATGGACAACCTTTATTAACCAACCACTCCACAAGGTTTCAAAGGA 540
 TCAAGTTTAAACCTGTAGAAGTTAACCGCAAGAACCAAGTTGCTCTTATAATGAACCTCT 600
 TCGGGTTCAACCGGTTTGCCAAAAGGTGTGCAACTTACTCATGAAAATTTGGTCACGCGT 660
 TTTTCTCAGCTAGAGATCCAATTTATGGAACCAAGTTTACCAGGCACGGCTATTTTA 720
 ACTGTAGTACCATTCCATCATGGTTTTGGTATGTTTACTACTTTAGGCTATCTAACTTGT 780
 GGTTTTCGTATTGTCTATGTTAACGAAATTTGACGAAGAGACTTTTTTAAACACTGCAA 840
 GATTACAAATGTTCAAGCGTTATTCTTGTACCGACTTTGTTTGAATTCTTAATAGAAGT 900
 GAATTACTCGATAAATATGATTTATCAAATTTAGTGGAAATTCATCTGGCGGAGCACCT 960

21

22

TTATCTAAAGAAATTGGTGAAGCTGTTGCTAGACGTTTTAATTTACCGGGTGTTCGTCAA 1020
 GGCTATGGTTTAAACAGAAACAACCTCTGCAATTATTATCACACCGGAAGCGGATGATAAA 1080
 CCAGGTGCTTCTGGCAAAGTTGTGCCATTATTAAAGCAAAGTTATCGATCTTGATACT 1140
 AAAAAAAGCTTTGGGCCCCGACAGACGTGGAGAAAGTTGTGTAAAGGGTCCTATGCTTATG 1200
 AAAGGTTATGTAGATAATCCAGAAGCAACAAGAGAAATCATAGATGAAGAAGGTGGTTG 1260
 CACACAGGAGATATTGGGTATTACGATGAAGAAAAACATTTCTTTATCGTGGATCGTTTG 1320
 AAGTCTTTAATCAAATACAAAGGATATCAAGTACCACCTGCTGAATTAGAATCTGTTCTT 1380
 TTGCAACATCCAAATATTTTGTATGCCGGGCTGTGCTGGCGTTCCAGATCCTATAGCTGGT 1440
 GAGCTTCCGGGAGCTGTTGTTGTACTTGAAGAAAGGAAATCTATGACTGAAAAAGAAAGTA 1500
 ATGGATTACGTTGCTAGTCAAGTTTCAAATGCAAAACGTTTGGTGGTGGTGTCCGTTTT 1560
 GTGGACGAAGTACCTAAAGGTCTCACTGGTAAAAATTGACGGTAAAGCAATTAGAGAAATA 1620
 CTGAAGAAACAGTTGCTAAGGGATCCATGGAAGCGCCAGCAGCAGCGAAATCAGTGGT 1680
 CACATCGTACGTTCCCGATGGTTGGTACTTTCTACCGCACCCCAAGCCCGACGCAAAA 1740
 GCGTTCATCGAAGTGGGTGAGAAAGTCAACGTGGGCGATACCGTGTGCATCGTTGAAGCC 1800
 ATGAAATGATGAACCAGATCGAAGCGGACAAATCCGGTACCGTGAAAGCAATTCTGGTC 1860
 GAAAGTGGACAACCGGTAGAATTTGACGAGCCGCTGGTGTCTATCGAG 1908

【0051】配列番号：9

配列の長さ：636

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

起源：Luciola lateralis

* 配列の特長：組み換え体プラスミドpHLf248 DNAの持つ

ピオチン化ホタルルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列より

演繹されるアミノ酸配列，602番目のLys残基がピオ

20 チンホロエンザイムシンセターゼの作用によりピオチン
化される

*

配列：

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu 15
 Pro Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg 30
 Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr 45
 Asn Ala Leu Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu 60
 Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val 75
 Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe 90
 Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala 105
 Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu 120
 Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu 135
 Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr 150
 Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly Tyr Gln Ser 165
 Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly 180
 Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu Gln Val Ala 195
 Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val 210
 Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala Arg 225
 Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu 240
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu 255
 Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe 270
 Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser 285
 Ser Val Ile Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser 300
 Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala 315
 Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala 330
 Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr 345
 Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys 360
 Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val 375
 Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly 390
 Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asp 405

Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu 420
 His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys His Phe Phe 435
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln 450
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro Asn 465
 Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly 480
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu Lys Gly Lys Ser Met 495
 Thr Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn 510
 Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro 525
 Lys Gly Leu Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile 540
 Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Gly Ser Met Glu Ala Pro Ala Ala 555
 Ala Glu Ile Ser Gly His Ile Val Arg Ser Pro Met Val Gly Thr 570
 Phe Tyr Arg Thr Pro Ser Pro Asp Ala Lys Ala Phe Ile Glu Val 585
 Gly Gln Lys Val Asn Val Gly Asp Thr Leu Cys Ile Val Glu Ala 600
 Met Lys Met Met Asn Gln Ile Glu Ala Asp Lys Ser Gly Thr Val 615
 Lys Ala Ile Leu Val Glu Ser Gly Gln Pro Val Glu Phe Asp Glu 630
 Pro Leu Val Val Ile Glu 636

【図面の簡単な説明】

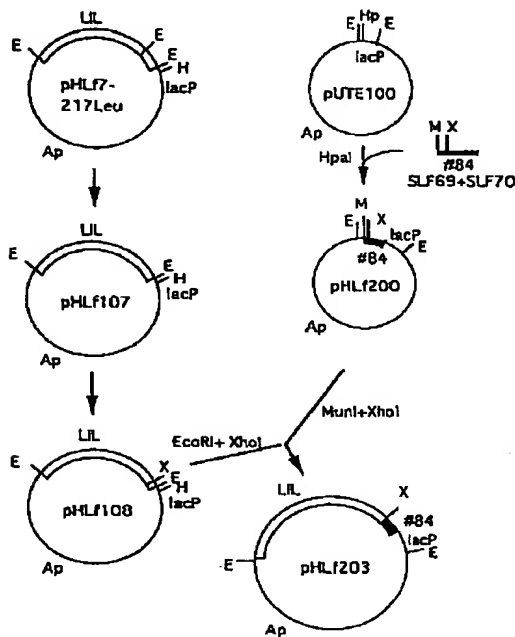
【図 1】 組み換え体プラスミド pHLf203DNA の構築
 図。

* 【図 2】 組み換え体プラスミド pHLf248DNA の構築
 図。

*

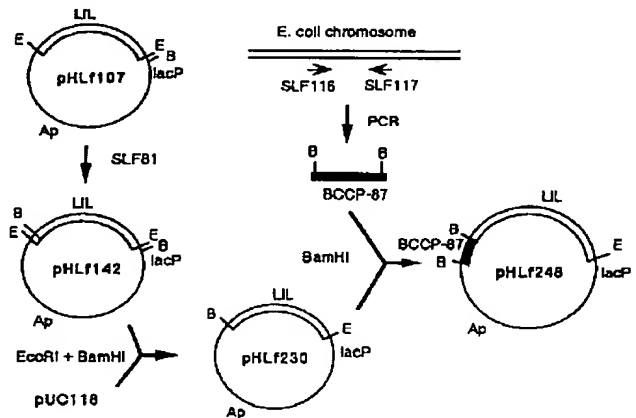
20

【図 1】



LIL, *Luciola lateralis* ルシフェラーゼ cDNA; #84, ビオテン化ペプチド #84; Ap, β -ラク
 タマーゼ遺伝子; lacP, β -ガラクトシダーゼ プロモーター; E, EcoRI; H, HindIII; Hp, HpaI;
 M, MluI; X, XhoI.

【図 2】



LIL, *Luciola lateralis* ルシフェラーゼ cDNA; Ap, β -ラク
 タマーゼ遺伝子; lacP, lacZ プロモーター; E, EcoRI; B, BamHI.

フロントページの続き

(72)発明者 小山 泰二

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
 株式会社内